

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz.

Vergleichende Untersuchungen zur
Isolierung von T - Mycoplasmen
aus klinischem Untersuchungs-
material.

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde der Medizin der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz, den
Medizinischen Fachbereichen

vorgelegt von

Helmut Bink
aus
Wetzlar

M a i n z 1975

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz.

Vergleichende Untersuchungen zur
Isolierung von T - Mycoplasmen
aus klinischem Untersuchungs-
material.

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde der Medizin der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz, den
Medizinischen Fachbereichen



vorgelegt von

Helmut Bink
aus
Wetzlar

M a i n z 1975

Fachbereichsdekan : Professor Dr. P. Klein

Referent : Professor Dr. W. Bredt

Korreferent : Professor Dr. D. Höffler



Meinen Eltern in Dankbarkeit
gewidmet !



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554415_0053

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
EINLEITUNG	1
Literaturübersicht	1
Problemstellung	9
MATERIAL und METHODEN	10
Untersuchungsmaterial	10
Nährböden	10
Verarbeitung des Materials	15
Bewertung und Identifizierung	17
Nährbödenvergleich mit Subkulturen	19
Photographie	20
ERGEBNISSE	21
Bakteriologische Befunde	21
Beschreibung der gefundenen Mycoplasma - Kolonien	21
Vergleich der flüssigen Medien	22
Vergleich der Agarnährböden	23
Vergleich flüssiger und fester Medien	28
Vergleich der Proben vor und nach Filtration	29
Quantitativer Vergleich mit Subkulturen	34
DISKUSSION	36
ZUSAMMENFASSUNG	42
LITERATUR	44

EINLEITUNG

1937 beschrieben DIENES und EDSALL (10) erstmals die Isolierung von "pleuropneumonia - like organisms" (PPL0) aus einem Abszess der Bartholin'schen Drüse. Seither wurden zahlreiche Mycoplasma - Spezies in menschlichem Untersuchungsmaterial gefunden.

So wurde vom Respirationstrakt Mycoplasma pneumoniae als bisher einzige Mycoplasma - Art mit gesicherter Humanpathogenität isoliert, außerdem fanden sich Mycoplasma orale I, II, III und Mycoplasma salivarium, für die bisher keine Pathogenität nachgewiesen werden konnte (17).

Im Urogenitaltrakt wurden Mycoplasma hominis und Mycoplasma fermentans gefunden (17).

SHEPARD (33) gelang es 1954, aus Urethralabstrichen von Männern mit nichtspezifischer bzw. nichtgonorrhöischer Urethritis (NGU) eine sich von den "klassischen" Mycoplasmen unterscheidende Mycoplasma - Spezies zu isolieren. Er beschrieb sie als "kleine, irreguläre, in das Agarmedium hineinwachsende Kolonien ohne Oberflächenwachstum" (34,35) und bezeichnete sie wegen ihrer geringen Größe als T - Mycoplasmen (T = tiny).

Seit neuestem werden die T - Mycoplasmen, wegen ihrer Fähigkeit Harnstoff zu spalten, auch als

Ureaplasma - urealyticum bezeichnet (40). Ich werde jedoch im weiteren noch die alte Bezeichnung "T - Mycoplasmen" beibehalten.

Über die Humanpathogenität dieser T - Mycoplasmen bestehen geteilte Ansichten.

SHEPARD (34,39,41) fand bei mehreren Untersuchungen männlicher NGU - Patienten in 60 - 93% der Fälle T - Mycoplasmen, dagegen bei Gesunden nur in 21 - 26%.

SUELTMANN et al. (48) isolierten in einer Untersuchung männlicher und weiblicher Studenten mit NGU in 68% der männlichen und 63% der weiblichen Untersuchten T - Mycoplasmen und vermuteten einen kausalen Zusammenhang.

CSONKA et al. (9) stimmten der Hypothese, T - Mycoplasmen erzeugten eine nichtgonorrhoeische Urethritis, nicht zu. Sie vermuteten aber, daß diese Organismen eine zusätzliche, nicht näher definierte Rolle in der Pathogenese dieser Erkrankung spielen könnten.

FORD et al. (12) fanden 1962 T - Mycoplasmen bei 60% der untersuchten 45 Kranken mit NGU und hielten diese ebenfalls für einen pathogenetischen Faktor.

HOFSTETTER und SCHMIEDT (19) isolierten 1970 bei Untersuchungen an 145 Kranken mit abakterieller akuter Urethritis, chronischer abakterieller Prostatitis und postgonorrhoeischer Prostataurethritis in 75 - 90% der Fälle Mycoplasmen. Von diesen waren 80 - 85% in der Lage, Harnstoff zu spalten.

Andere Autoren sahen keinen kausalen Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von T - Mycoplasmen in entsprechenden Untersuchungsmaterialien und der nichtgonorrhoeischen Urethritis.

So fanden BLACK und RASMUSSEN (1) in 46,6% der Patienten mit NGU T - Mycoplasmen, bei Patienten mit Gonorrhoe in 35% und bei gesunden Personen mit Kontakt zu Gonorrhoe - Patienten in 54,3% der Fälle.

FOWLER und LEEMING (13) gelangten zu einem ähnlichen Ergebnis.

JANSSON et al. (21) isolierten bei ihrer Untersuchung von Patienten mit NGU in 58% der Fälle T - Mycoplasmen. Bei Patienten ohne diese Erkrankung lag die Isolierungsrate etwa gleichhoch (53%).

BONISSOL et al. (2) fanden T - Mycoplasmen bei 32% der männlichen und 55,6% der weiblichen Patienten mit urethralen oder vaginalen Infekten.

BREDT (3) ist der Ansicht, daß weder die höhere Isolierungsfrequenz von T - Mycoplasmen bei Patienten mit nichtspezifischer Urethritis, noch Behandlungserfolge durch mycoplasmawirksame Mittel und die Hinweise auf Partnerinfektion und Behandlungsmißerfolge bei Behandlung nur eines Partners ausreichen, um T - Mycoplasmen als die hauptsächlichen Erreger der unspezifischen Urethritis zu bezeichnen. Jedoch hält er ihre ätiologische Beteiligung in einem noch unbekannten Prozentsatz unter derzeit ebenfalls noch unbekannten Voraussetzungen für möglich.

Auch bei anderen Erkrankungen wird eine pathogenetische Beteiligung von T - Mycoplasmen diskutiert.

JONES und TOBIN (22) beschrieben fünf Fälle, bei denen nach Kaiserschnitt durch Abstriche von der Amnionoberfläche T -Mycoplasmen nachgewiesen werden konnten.

KLEIN et al. (24) fanden bei der Untersuchung Neugeborener mit Geburtsgewichten unter 2500 g in 22% der Fälle einen Befall mit Mycoplasmen. Dabei handelte es sich meist um T -Mycoplasmen, in den restlichen Fällen um Mycoplasma hominis. Die Autoren vermuteten eine Kolonisation mit T - Mycoplasmen während der Passage durch den Geburtskanal.

FOY et al. (14) untersuchten Neugeborene siebenmal während des ersten Lebensjahres und noch einmal im dritten Lebensjahr auf Befall mit T - Mycoplasmen. Sie fanden eine Besiedlung von 38% der männlichen und von 6% der weiblichen Neugeborenen direkt nach der Geburt. Nach drei Monaten sank die Isolierungsrate steil ab, und nach zwei Jahren waren keine T - Mycoplasmen mehr nachzuweisen.

SOMPOLINSKY (47) und CASPI (4) beschrieben zwei Fälle einer puerperalen Sepsis, die wahrscheinlich durch T - Mycoplasmen verursacht worden waren.

ROMANO et al. (32) fanden T - Mycoplasmen in Herz und Lunge eines abortierten Feten mit intrauteriner Bronchopneumonie.

CASPI (5) und KUNDSIN (26) diskutierten einen

Zusammenhang zwischen der Infektion Schwangerer mit T - Mycoplasmen und nachfolgenden Spontanaborten.

KUNDSIN et al. (25) beschrieben chromosomale Aberrationen wie Chromatidbrüche und Tetraploidie in humanen Lymphozytenkulturen, die durch T - Mycoplasmen induziert worden waren.

Umstritten ist eine Beziehung zwischen dem Vorkommen von T - Mycoplasmen im weiblichen und männlichen Urogenitaltrakt und daraus resultierender Infertilität (15,20).

Möglicherweise spielen bei der Pathogenese der verschiedenen diskutierten Erkrankungen T - Mycoplasmen mit heterogenen Serotypen eine Rolle (6,10,29,31).

Die Isolierung und Züchtung der T - Mycoplasmen aus den verschiedenen Untersuchungsmaterialien war seit ihrer Entdeckung mit Schwierigkeiten behaftet. So sind differente Befunde verschiedener Autoren nicht nur durch Unterschiede in den untersuchten Patientenkollektiven, sondern auch durch andersartige Untersuchungsmethoden bedingt. Die methodischen Schwierigkeiten resultieren hauptsächlich aus den relativ hohen Nährbodenansprüchen, die von den T - Mycoplasmen gestellt werden.

SHEPARD (33) benutzte 1954 bei seiner ersten Isolierung von T - Mycoplasmen einen Nährboden aus Tryptic Beef Heart, Pferdeerythrocyten und Agar, den er auf pH 7,8 - 8,0 einstellte. Die geringe Größe der von ihm damals gefundenen Kolonien, ist wohl auf diesen ungünstigen pH - Wert des Nährbodens zurückzuführen (38). Seitdem sind Nährböden und Methoden verbessert worden.

SHEPARD und LUNCEFORD (43) fanden 1965, daß bei steigender Azidität des Nährbodens auch der Koloniedurchmesser zunahm. Gleichzeitig stieg auch die Anzahl der entdeckten kolonienbildenden Einheiten (kbE). Optimale Ergebnisse wurden bei pH 6,0 erreicht, dagegen wirkten pH - Werte von $>$ pH 8,0 in flüssigen Medien inhibitorisch. Weil die Kulturen selten länger als 24 h lebensfähig blieben, nahm man an, daß ein im Nährmedium befindlicher Metabolit schnell verbraucht würde.

SHEPARD und LUNCEFORD (45) sowie FORD und MAC DONALD (11) fanden 1967 heraus, daß es sich bei diesem Metaboliten um Harnstoff handelte. Mit dieser Entdeckung der Urease in T - Mycoplasmen (45) wurde eine Möglichkeit gefunden, T - Mycoplasmen zu identifizieren, ohne allein auf die morphologische Beurteilung wachsender Kolonien angewiesen zu sein. Andere Mycoplasma - Spezies besitzen nach bisheriger Kenntnis keine Urease.

HOFSTETTER (19) verwendete 1970 einen Nährboden, der die Harnstoffspaltung der T - Mycoplasmen

ausnutzte, ohne jedoch die Zusammensetzung näher zu beschreiben.

Auch der Nachweis von T - Mycoplasmen in flüssigen Medien gelang nach der Entdeckung der Urease in T - Mycoplasmen leichter. Hierbei wurde die pH - Erhöhung des Mediums ausgenutzt, die aus der Entstehung von NH_3 beim Urea - Abbau resultierte. Diese Alkalisierung konnte durch den Zusatz eines geeigneten Indikators (Phenolrot) zu dem Nährmedium sichtbar gemacht werden. Auf diesem Prinzip beruht das von SHEPARD (46) beschriebene Indikator - Medium U_9 , das infolge seiner geringen Pufferung schon kleine NH_3 - Mengen anzeigt.

Daneben beschrieb SHEPARD (42) 1970 auch einen Differential - Agarnährboden A_6 , der ebenfalls die Ureaspaltung der T - Mycoplasmen zu ihrer Identifizierung ausnutzt. Dazu fügte er einem von ihm bisher verwendeten Agar - Nährboden A_5c eine 0,03%ige Manganchloridlösung hinzu (Endkonzentration) (42). Bei Wachstum von T - Mycoplasmen lagert sich auf der Oberfläche der Kolonien Mangandioxid nach der folgenden Reaktion ab:



Die Kolonien fallen dann durch eine dunkle, goldbraune Färbung auf. Gleiche Ergebnisse werden auch bei Verwendung anderer Reagenzien wie $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ u.a. erreicht (42).

BONISSOL et al. (2) haben schon gute Erfahrungen mit einem derartigen Nährboden gemacht.

Die Identifizierung der gefundenen Urea - positiven Kolonien wird durch das besondere Verhalten der T - Mycoplasmen gegenüber bestimmten Antibiotika erleichtert. So zeigen sie eine selektive Sensibilität gegenüber Erythromycin (23), und zwar sowohl in vitro (44) als auch in vivo (36,50). Gegenüber Lincomycin verhalten sich T - Mycoplasmen resistent (7,8). Dies hat Bedeutung bei der Differenzierung zu Mycoplasma hominis, das oft neben T - Mycoplasmen im Urogenitaltrakt isoliert werden kann: Mycoplasma hominis zeigt Erythromycin - Resistenz und Lincomycin - Sensibilität (7,8,36).

Der Nachweis von T - Mycoplasmen und Großkolonien - Mycoplasmen wird gelegentlich trotz Verwendung inhibitorischer Substanzen (Penicillin) durch reichliches Bakterienwachstum behindert oder unmöglich gemacht. Da Mycoplasmen filtrierbar sind (17), besteht zumindest theoretisch eine Möglichkeit, unerwünschte Bakterien durch Filtration des Untersuchungsmaterials abzutrennen. Diese Methode wurde schon bei der Isolierung von L - Formen angewandt (16,49).

Aufgabe dieser Arbeit sollte es sein, anhand von Routinematerial die beschriebenen Differentialnährböden mit konventionellen Medien zu vergleichen. Zusätzlich sollte eine Aussage über den Wert einer Vorfiltration des Untersuchungsmaterials versucht werden.

Folgende Fragestellungen sollten beantwortet werden:

Sind die von SHEPARD beschriebenen Agarnährböden A₅c und A₆ zur Züchtung und Identifizierung von T - Mycoplasmen gleichgut geeignet?

Lassen sich T - Mycoplasmen mit dem von SHEPARD beschriebenen flüssigen Medium U₉ besser nachweisen als mit einem bisher verwendeten flüssigen "Urea" - Medium?

Welche Korrelation besteht zwischen positiven T - Mycoplasma Befunden in den verwendeten flüssigen Medien mit entsprechenden Befunden auf den Agarnährböden?

Ist es möglich, durch Filtration des Untersuchungsmaterials durch ein Nucleopore - Filter mit 0,4 µm Porengröße selektiv T - Mycoplasmen in die Nährmedien zu inokulieren, und zugleich unerwünschte Bakterien zurückzuhalten?

MATERIAL und METHODEN

Untersuchungsmaterial

Untersucht wurden Mittelstrahlurine, die dem Institut für Medizinische Mikrobiologie von den Universitätskliniken Mainz zur bakteriologischen Untersuchung eingesandt wurden. Eine besondere Auswahl wurde nicht getroffen. Im einzelnen stammten von den insgesamt 144 Urinen:

aus der 1. und 2. Med.Klinik und Poliklinik	66
aus der Urologischen Klinik und Poliklinik	29
aus der Kinderklinik	17
aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik	17
aus anderen Kliniken	15

Alle Proben wurden im Urinlabor des Institutes für Medizinische Mikrobiologie bakteriologisch untersucht. Die Ergebnisse wurden übernommen.

Nährböden

Herstellung des 25%igen Hefeextraktes:

250 g der pulverförmigen Hefe (Fleischmann) wurden in 1000 ml Aqua dest. gegeben und aufgekocht. Der Extrakt wurde grob gefiltert und anschließend durch Zugabe von 1N HCL auf pH 6,0 eingestellt. Durch Zentrifugation bei 4500 U/min

während 10 Minuten wurden die nicht lösbaeren Anteile abgetrennt. Das Sediment wurde verworfen, der Überstand 15 Minuten bei 121° Celsius autoklaviert und bei -20° Celsius eingefroren.

Herstellung der 10%igen Harnstofflösung:

10 g kristallinen Harnstoffes (Merck) wurden in 100 ml Aqua dest. gelöst. Durch Filtration durch einen 0,2 µm Membranfilter (Sartorius) wurde die Lösung sterilisiert und bei -20° Celsius aufbewahrt.

Herstellung von Penicillinlösung:

1 000 000 I.E. Penicillin G (Hoechst) wurden in 10 ml Aqua dest. gelöst, zu je 1 ml (100 000 I.E.) abgefüllt und bis zum Verbrauch in verschlossenen Glasröhrchen bei -20° Celsius aufbewahrt.

Herstellung der 0,2%igen Phenolrotlösung:

0,2 g Phenolrot (Serva, Heidelberg) wurden durch Erwärmen in 4 ml Aqua dest. und 2 ml NaOH gelöst und mit 1N HCl auf pH 7,2 eingestellt. Die Lösung wurde mit Aqua dest. auf 100 ml aufgefüllt, autoklaviert und bis zum Verbrauch bei 4° Celsius aufbewahrt.

Herstellung der Agar - Medien:

Als Agarnährböden zur Isolierung und Züchtung von T - Mycoplasmen verwendeten wir die von SHEPARD zuerst beschriebenen Nährböden A₆ und A_{5c} (42). Von den Grundmedien dieser Nährböden standen uns zusätzlich pulverförmige Proben von SHEPARD zur Verfügung.

Das Agar - Grundmedium A₆ wurde wie folgt hergestellt:

Zu 80 ml Aqua dest. wurden 2,4 g Trypticase Soy Broth Powder (B-D Merieux) und 0,03 g Mangan (II)-sulfat-1-hydrat (Merck) gegeben. Beide Stoffe lösten sich nach leichtem Schütteln. Die Lösung wurde durch Hinzupipettieren von 1N HCl auf pH 5,5 adjustiert und in 100 ml Glasflaschen mit Schraubverschluß gegeben. Anschließend wurden 0,85 g Ionagar Nr. 2 (Oxoid Ltd., London) hinzugegeben. Das Gemisch wurde dann in der verschlossenen Flasche, ohne vorheriges Lösen des Ionagars, bei 121° Celsius für 15 Minuten autoklaviert. Anschließend wurde der Nährboden in einem Wasserbad auf 56° Celsius abgekühlt und gemischt. Nach Abkühlung des Grundnährbodens wurden folgende Bestandteile zugefügt:

- 20 ml steriles, nicht erhitztes Pferdeserum pH ca. 7,3 (Microbiological Associates, Bethesda / Md).
- 1 ml eines 25%igen Hefeextraktes (Fleischmann)
- 1 ml einer 10%igen Urealösung (Merck)
- 100 000 I.E. Penicillin G (Hoechst), enthalten in 1 ml Aqua dest. .

Das Agar - Grundmedium A_{5c} wurde wie folgt hergestellt:

Das Agar - Grundmedium A_{5c} enthielt keinen Zusatz eines Mangansalzes. In Zusammensetzung und Herstellung unterschied es sich im übrigen nicht

von dem Agar - Grundmedium A₆. Auch die Vervollständigung zum fertigen Nährboden erfolgte wie bei dem Agarnährboden A₆.

Zum Vergleich der eben beschriebenen eigenen Medien lagen von SHEPARD hergestellte Grundmedien in Pulverform vor. Sie wurden nach der mitgegebenen Vorschrift aufgelöst und in gleicher Weise wie die eigenen Grundmedien ergänzt.

Die fertigen Medien A₆ und A₅C wurden zu je 5 ml in Petrischalen 60 x 15 mm (Greiner & Söhne) pipettiert. Nach Erstarren der Nährböden wurden die Petrischalen mit den Nährböden für 24 h bei Zimmertemperatur unter Lichtabschluß stengelassen. Anschließend wurden sie bei 4° Celsius für längstens 6 Tage aufbewahrt.

Die Herstellung des Grundmediums, die Vervollständigung zum fertigen Nährboden sowie das Gießen der Agarplatten geschahen immer in einem Arbeitsgang am gleichen Tag.

Herstellung der flüssigen Nährmedien:

Als flüssige Medien zur Züchtung und Isolierung von T - Mycoplasmen aus Mittelstrahlurin wurden ein im hiesigen Labor bereits erprobtes Urea - Medium sowie das von SHEPARD (46) beschriebene flüssige Nährmedien U₉ verwendet. Vom Grundmedium des Nährbodens U₉ stand uns zusätzlich eine pulverförmige Probe von SHEPARD zur Verfügung.

Das Urea - Medium wurde wie folgt hergestellt:

Das Grundmedium bestand aus 2,1 g PPLO - Broth (Difco), welches in 100 ml Aqua dest. bei Erwärmen gelöst wurde. Mit 1N HCl wurde die Lösung auf pH 5,5 adjustiert und bei 121° Celsius während 15 Minuten autoklaviert. Zu 70 ml des auf Zimmertemperatur abgekühlten Grundmediums wurden dann in nachstehender Reihenfolge hinzugefügt:

- 1 ml Phenolrotlösung 0,2%
- 10 ml Hefeextrakt 25% pH 6,0
- 20 ml inaktiviertes (56°C - 30 Minuten) Pferdeserum
- 1 ml Harnstofflösung 10%
- 1 ml = 100 000 I.E. Penicillin G

Das fertige Urea - Medium hatte ein pH von 6,0 ⁺ 0,2 und eine gelbe Färbung. Von dem fertigen Urea - Medium wurden je 2,0 ml in etwa 4,0 ml fassende sterile Glasröhrchen mit Schraubverschluß abgefüllt. Die abgefüllten Röhrchen wurden bei -20° Celsius aufbewahrt und bei Bedarf aufgetaut.

Das flüssige Medium U₉ wurde wie folgt hergestellt:

Zur Herstellung des Grundmediums wurden in 100 ml Aqua dest. folgende Bestandteile gelöst:

- | | | |
|--------|-------------------------------------|---------|
| 0,75 g | Tryptic Digest Broth Powder (Difco) | |
| 0,50 g | NaCl | (Merck) |
| 0,02 g | KH ₂ PO ₄ | (Merck) |

Mit 1N HCl wurde die Lösung auf pH 5,5 eingestellt, in 100 ml fassende Glasflaschen gefüllt und 15 Minuten bei 121° Celsius autoklaviert. Zu 95 ml des auf Zimmertemperatur abgekühlten Grundmediums wurden hinzugefügt:

4,00 ml nicht erhitztes Pferdeserum
0,50 ml Harnstofflösung 10%
0,05 ml Phenolrotlösung 0,2%
1,00 ml = 100 000 I.E. Penicillin G

Die von SHEPARD zur Verfügung gestellte Probe wurde nach seinen Vorschriften gelöst und analog dem eigenen Grundmedium ergänzt.

Das fertige flüssige Medium U₉ hatte ein pH von 6,0 ⁺ 0,2 und eine gelbe Färbung. Es wurde sorgfältig gemischt und wie das Urea - Medium abgefüllt und aufbewahrt.

Allen benutzten Medien wurde kein Thalliumazetat hinzugefügt, weil dieses das Wachstum der T - Mycoplasmen hemmt (28).

Verarbeitung des Materials

Die eingeschickten Urine wurden nach etwa 3 - 6 Stunden verarbeitet. Nach Möglichkeit wurde darauf geachtet, die Urine während dieser Zeitspanne bei einer Temperatur von 4° Celsius

aufzubewahren. Vor der Verarbeitung wurden die Urine durch Schütteln resuspendiert.

Filtration: Mit einer sterilen 2 ml - Einmalspritze wurde etwa 1 ml Urin entnommen und durch ein steriles Nucleopore - Filter mit $0,4 \mu\text{m}$ Porengröße (General Electric Co.) filtriert.

Beimpfung der Nährböden: Jede Urinprobe wurde auf folgende Nährböden gegeben:

- | | |
|--------------------|--------------------------------|
| a) unfiltriert auf | 1 Agarnährboden A_6 |
| | 1 Agarnährboden A_{5c} |
| | 2 flüssige Urea - Nährmedien |
| | 1 flüssiges U_9 - Nährmedium |
| b) filtriert auf | 1 Agarnährboden A_6 |
| | 1 flüssiges U_9 - Nährmedium |

Die Agarnährböden wurden mit jeweils $3 \times 10 \mu\text{l}$ des unfiltrierten oder filtrierten Urins beimpft. Die Beimpfung erfolgte mit Hilfe von Mikroliter - Pipetten (Eppendorf) und den dazugehörigen Pipettenspitzen, die vor Gebrauch 15 Minuten bei 121° Celsius autoklaviert wurden. Die beimpften Agarplatten wurden in Anaerobentöpfe (BTL) gegeben. Die Töpfe wurden verschlossen, mit einer Wasserstrahlpumpe mehrmals evakuiert und mit einem Gasgemisch (80% N_2 und 20% CO_2) gefüllt. Die Bebrütung erfolgte bei 37° Celsius.

Die Röhrchen mit den flüssigen Medien wurden mit jeweils $100 \mu\text{l}$ der unfiltrierten oder filtrierten Urinprobe beimpft.

Eines der beiden mit unfiltriertem Inoculum beimpften Urea - Nährmedien wurde bei Zimmertemperatur, das andere sowie die beiden flüssigen U₉ - Nährmedien bei 37⁰ Celsius inkubiert.

Bewertung und Identifizierung

Ablesung der Agarnährböden: Nach zwei und vier Tagen wurden die Platten unter einem Plattenmikroskop (Leitz, Wetzlar) mit 10 - 40-facher Vergrößerung betrachtet. Dabei wurden beurteilt:

1. Die Anzahl der T - Mycoplasma - Kolonien.
Auf dem A₅C - Agarnährboden wurden kleine Kolonien (Durchmesser der Kolonien 10 - 50 µm) als T - Mycoplasma - Kolonien angesehen.
2. Die Färbung der Kolonien.
3. Die Morphologie der Kolonien, insbesondere ihre Größe (30,38).
4. Das Erscheinen von T - Mycoplasma - Kolonien an Epithelien oder in anderen Mycoplasma - Kolonien.
5. Veränderungen von Anzahl und Größe der T - Mycoplasma - Kolonien vom zweiten bis zum vierten Tag der Beurteilung.

Ablesung der flüssigen Nährmedien: Bei den flüssigen Medien (Urea und U₉) wurde der Farbumschlag

von Gelb nach einem kräftigen Rot bewertet. Die Röhrchen wurden täglich angesehen, und der Tag des eventuellen Farbumschlages notiert. Nicht bewertet wurden Farbumschläge, die mit einer starken Trübung einhergingen. Hier konnte ein überwiegendes Wachstum von Bakterien oder Sproßpilzen vermutet werden (46).

Identifizierung: Für die Identifizierung der T - Mycoplasmen wurden folgende Kriterien herangezogen:

1. Urea - Spaltung in einer Subkultur in dem flüssigen Urea - Medium (45).
2. Empfindlichkeit der wachsenden Kolonien gegenüber Erythromycin und Resistenz gegenüber Lincomycin (7,8,30,44).

Von den Agarnährböden wurden nur diejenigen Kolonien untersucht, die auf Grund ihrer Braunfärbung auf dem A₆ - Nährboden und ihrer geringen Größe als T - Mycoplasmen angesehen wurden. Derartige Kolonien wurden mit einem Agarblock ausgestochen und in das flüssige Urea - Nährmedium gegeben. Eine folgende Rotfärbung des Nährmediums, nach entsprechender Bebrütung bei 37⁰ Celsius, wurde als Nachweis einer Urea - Spaltung bewertet.

Von dieser oder einer anderen Subkultur wurde ein Tropfen auf eine A₆ - Agarplatte gegeben. Anschließend wurden je ein Erythromycin - Plättchen (10 µg) und ein Lincomycin - Plättchen (15 µg) aufgelegt. Der Test wurde am dritten und vierten Tag abgelesen.

Bei positiven flüssigen Originalkulturen wurden folgende Subkulturen angelegt:

- a) Subkultur in ein flüssiges Urea - Medium.
Die Subkultur wurde bis zu einer etwaigen erneuten Rotfärbung bei 37° Celsius bebrütet.
- b) Subkultur auf einen A₆ - Agarnährboden.
Die Subkultur wurde im Anaerobentopf bei 37° Celsius bebrütet und nach zwei und vier Tagen unter dem Plattenmikroskop beurteilt.

Hierbei wurde mit denselben Methoden, Mitteln und Mengen gearbeitet, die schon bei der primären Beimpfung der flüssigen Medien bzw. der Agarnährböden beschrieben wurden.

Bei Rötung der flüssigen Subkulturen, dem Wachstum kleiner brauner Kolonien sowie einem positiven Erythromycin - Lincomycin - Test wurde die Diagnose "T - Mycoplasmen" gestellt.

Nährbodenvergleich mit Subkulturen: Abschließend wurde zur quantitativen Beurteilung der verschiedenen Nährböden ein Konzentrationsversuch durchgeführt. Dazu wurde eine laboreigene T - Mycoplasma - Kultur in abfallenden Konzentrationen von 10⁰ bis 10⁻⁶ in PPL0 - Broth (Difco) gegeben. Von jeder Konzentrationsstufe wurden je 3 x 10 µl sowohl auf die selbst hergestellten A₆ - Agarnährböden als auch auf die uns von

SHEPARD zur Verfügung gestellten A₆ - Agarnährböden beimpft.

Mit jeweils 50 µl wurden die flüssigen Medien U₉ (selbst hergestellt), U₉ (SHEPARD'sche Probe) und das Urea - Medium beimpft. Die Kulturen wurden bei 37⁰ Celsius inkubiert (s.o.). Beurteilt wurde der Zeitpunkt, an dem es in den flüssigen Medien zu einem Farbumschlag von Gelb nach Rot kam, und die Anzahl der Kolonien bei Auszählung am dritten und fünften Tag bei den Agarnährböden.

Photographie: In einigen Fällen wurden typische T - Mycoplasma - Kolonien auf einen Schwarz-Weiß-Film (Kodak) mit einem Photomikroskop (Zeiss) photographiert.

ERGEBNISSE

Bei der Untersuchung der 144 Mittelstrahlurine wurden in 22 Fällen T- Mycoplasmen gefunden. Bei 19 dieser 22 Befunde ergab auch die bakteriologische Untersuchung des Urinlabors des Instituts für Medizinische Mikrobiologie eine bakterielle Kontamination der Urine. In drei Fällen lag kein positiver bakteriologischer Befund vor. Die 19 kontaminierten Urine enthielten:

Mischflora	in 5 Fällen
Keimzahl $< 10^3$	in 3 Fällen
E. coli	in 3 Fällen
Pseudomonas aeruginosa	in 2 Fällen
Enterokokken	in 3 Fällen
vergrünende Streptokokken	in 1 Fall.
Proteus	wurde in keinem Fall gefunden.

Beschreibung der gefundenen Mycoplasma - Kolonien

Die T - Mycoplasma - Kolonien auf dem Agarmedium A₆ fielen in allen Fällen durch ihre ausgeprägte Braunfärbung auf. Es handelte sich um kleine Kolonien mit einem Durchmesser von 20 - 50 μ m, die sich von der Umgebung unregelmäßig absetzten. Ihre Oberfläche erschien granuliert. Die Braunfärbung der Kolonien war am intensivsten an der Peripherie, in ihrem Zentrum waren Aufhellungen zu sehen.

Auf dem Agarmedium A₅c fanden sich T - Mycoplasma - Kolonien von gleicher Größe und Morphologie wie auf dem Vergleichsmedium. Ihre Farbe unterschied sich nur geringfügig von der des Nährbodens.

Die gefundenen Mycoplasma hominis - Kolonien zeigten die typische "Spiegelei" - Form mit einem runden, gelblich - braun gefärbten, leicht granulierten Zentrum und einer transparenten, oft runden peripheren Zone von unterschiedlicher Breite. Diese Kolonien hatten Durchmesser von 200 - 500 µm.

Vergleich der flüssigen Medien (Urea - Medium, U₉ - Medium)

Bei insgesamt 22 positiven Proben zeigte sich im Urea - Medium 20 mal eine Rotfärbung. Im Vergleichsmedium U₉ wurde in allen 22 Fällen eine Rotfärbung beobachtet. Die jeweiligen Zeitpunkte des Farbumschlages sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Tab. 1: Zeitpunkt des Farbumschlages in den flüssigen Medien.

Art d. Mediums	1.Tag	positiv am			negativ
		2.Tag	3.Tag	4.Tag	
UREA	7	12	1	-	2
U ₉	14	8	-	-	-

Bei den 20 Proben, bei denen sowohl in Urea - Medium als auch in dem U_9 - Medium eine Rotfärbung aufgetreten war, geschah dies in 10 Fällen am gleichen Tag (Tabelle 2). Dabei wurden 3 Fälle, bei denen eine um einige Stunden (bis zu 6 h) früher als in dem Urea - Medium aufgetretene Rötung in Medium U_9 beobachtet wurde, als "gleichzeitig aufgetreten" bewertet.

Insgesamt erwies sich das U_9 - Medium als empfindlicher.

Tab. 2: Erstes Auftreten eines Farbumschlages bei 20 Proben, die in Urea - Medium und U_9 - Medium positiv waren.

Proben insgesamt (in beiden Fällen positiv)	zuerst in Urea	zuerst in U_9	zugleich
20	2	8	10

Vergleich der beiden Agarnährböden (A_6 und A_{5c})

T - Mycoplasma - Kolonien auf einem der beiden Agarnährböden konnten in 19 Fällen nachgewiesen werden. In allen 19 Fällen fanden sich Kolonien auf dem A_6 - Nährboden. Auf dem A_{5c} - Agar wurden nur in 16 Fällen T - Mycoplasma - Kolonien gefunden (Tabelle 3).

Tab. 3: Nachweis von T - Mycoplasmen auf den Agarnährböden A₆ und A₅c.

Positive Befunde insgesamt	positiv auf A ₆	positiv auf A ₅
19	19	16

Die T - Mycoplasma - Kolonien auf Agar - Medium A₆ zeigten in allen Fällen eine intensive Braunfärbung. In einem Fall war diese nach zweitägiger Bebrütung nur schwach ausgeprägt; nach weiteren zwei Tagen fand sich auch hier eine starke, goldbraune Färbung der Kolonien.

In 3 der 19 Fällen konnten T - Mycoplasma - Kolonien auf beiden Nährböden erst nach viertägiger Inkubation nachgewiesen werden,

In 3 weiteren Fällen fanden sich auf den beiden Agarnährböden neben den T - Mycoplasma - Kolonien auch Kolonien von Mycoplasma hominis (Bild I).

In einem Fall waren die T - Mycoplasma - Kolonien Epithelzellen angelagert (Bild II). Dieser Befund ließ sich nur auf dem A₆ - Agarnährboden erheben.

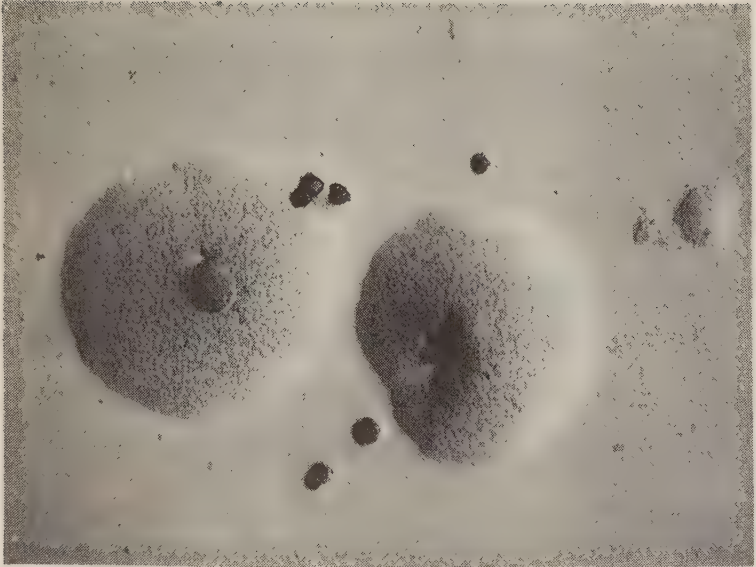


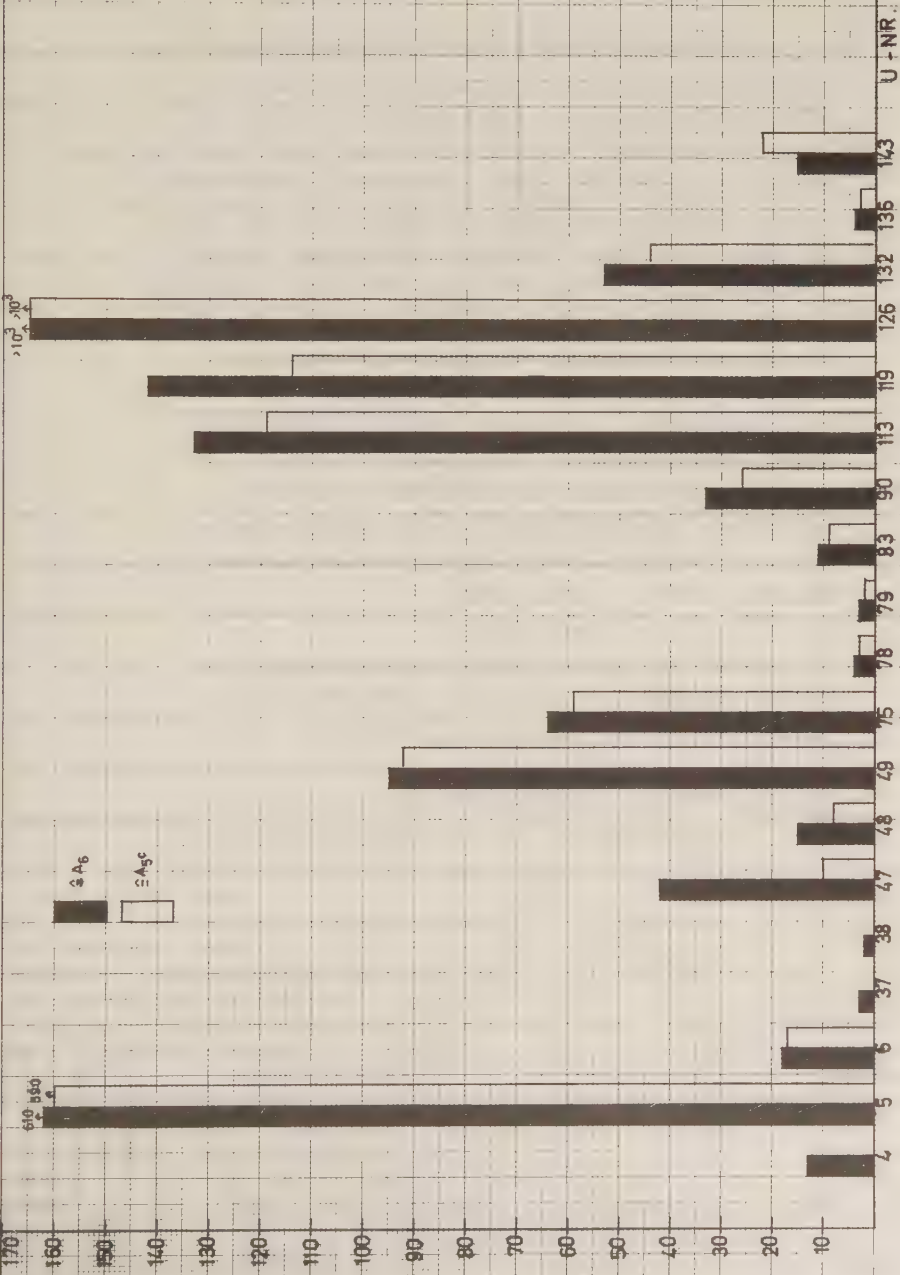
Bild I: Dunkelgefärbte T - Mycoplasma - Kolonien, die neben und in klassischen "Spiegelei" - Kolonien von Mycoplasma hominis wachsen.



Bild II: Vermehrtes Wachstum und Anlagerung von T - Mycoplasma - Kolonien an Epithelien.

Der Vergleich der Kolonienzahlen auf den beiden Agarnährböden brachte in 17 Fällen höhere Kolonienzahlen auf dem A_6 - Medium. In einem Fall fanden sich auf beiden Nährböden $>10^3$ Kolonien. Einmal wurden auf dem A_{5c} - Nährboden mehr Kolonien ausgezählt als auf dem Vergleichsnährboden. Eine Gegenüberstellung der ausgezählten Kolonien zeigt die Tabelle 4.

Tab. 4: Wachstum von T - Mycoplasma - Kolonien
auf den Agarnährböden A₆ und A_{5c}. Zahl
der Kolonien in kbL / 10 Al.



Vergleich flüssiger und fester Medien (U_9 und A_6)

Da sich die Nährmedien A_6 und U_9 am empfindlichsten gezeigt hatten, wurden diese beiden miteinander verglichen.

In 19 Fällen fand sich bei Rotfärbung des beimpften flüssigen Mediums U_9 auch ein Wachstum von T - Mycoplasma - Kolonien auf dem A_6 - Agar (Tab. 5). Dreimal wurde zwar eine Rötung des flüssigen Mediums beobachtet, jedoch konnten auf dem Agarmedium keine T - Mycoplasma - Kolonien nachgewiesen werden. Das lag in zwei Fällen an der starken bakteriellen Kontamination der Agarplatten, die eine Auswertung unmöglich machte. In diesen beiden Fällen wurden aber T - Mycoplasma - Kolonien auf der mit filtriertem Urin beimpften Agarplatte und der A_6 - Subkulturplatte gefunden, so daß auch ein Wachstum von T - Mycoplasmen auf den kontaminierten Platten vermutet werden kann.

In keinem Fall fanden sich T - Mycoplasma - Kolonien auf dem A_6 - Agar ohne positiven Befund in entsprechenden flüssigen U_9 - Medien.

Tab. 5: Positive und negative Befunde auf Agarnährboden A_6 und dem flüssigen Medium U_9

		A_6 - Agar	
		+	-
U_9	+	19	1 ^{x)}
	-	-	122

^{x)} A_6 bei zwei weiteren Proben wegen Kontamination nicht ablesbar.

Vergleich der Proben vor und nach Filtration

Bei Beimpfung des flüssigen Mediums U_9 mit unfiltriertem (U_9) und filtriertem (U_{9f}) Untersuchungsmaterial, fand sich nach Inkubation 13 mal in beiden Fällen ein Farbumschlag. 9 mal war der Befund nur in dem mit unfiltriertem Inoculum beimpften Medium positiv (Tabelle 6).

Tab. 6: Auftreten eines Farbumschlages bei Beimpfung des flüssigen Nährmediums U_9 mit unfiltriertem (U_9) und filtriertem (U_{9f}) Inoculum.

		<u>Medium U_9</u>	
		Urin unfiltriert	
		+	-
Urin filtr.	+	13	-
	-	9	122

Die 22 positiven Befunde auf dem mit unfiltriertem Untersuchungsmaterial beimpften Medium U_9 (U_9) fanden sich in den ersten beiden Tagen nach Beginn der Inkubation.

Bei den mit unfiltriertem Urin beimpften U_9 - Medien (U_9f) wurden nur 13 positive Befunde erhoben. Hier zögerte sich teilweise der Farbumschlag bis zum vierten Tage hinaus.

Tabelle 7 zeigt eine Aufstellung, die über den Zeitpunkt der positiven Reaktionen Auskunft gibt.

Tab. 7: Erstes Auftreten. eines Farbumschlages in Medium U_9 bei unfiltriertem (U_9) und filtriertem (U_9f) Inoculum.

Art d. Mediums	1.Tag	2.Tag	3.Tag	4.Tag	negativ
U_9	14	8	-	-	-
U_9f	4	7	1	1	9

Agarnährböden: Bei den 19 auf A_6 - Agarnährböden positiven Urinen wurden nach Filtration nur noch in 12 Fällen T - Mycoplasmen gefunden. Zweimal waren die mit unfiltriertem Untersuchungsmaterial beimpften A_6 - Platten (A_6) durch starkes Bakteriumwachstum nicht beurteilbar (Tab. 8). In diesen beiden Fällen wurde auf den mit filtriertem Urin beimpften A_6 - Platten (A_6^f) keine Kontamination gesehen. Hier konnten dadurch T - Mycoplasmen nachgewiesen werden.

Die Kolonien zeigten sowohl auf A_6 als auch auf A_6^f stets eine typische und ausgeprägte Braunfärbung.

In einem Fall wurden auf A_6 reichlich Epithelien beobachtet. Nach der Filtration waren sie auf A_6^f nicht mehr zu finden.

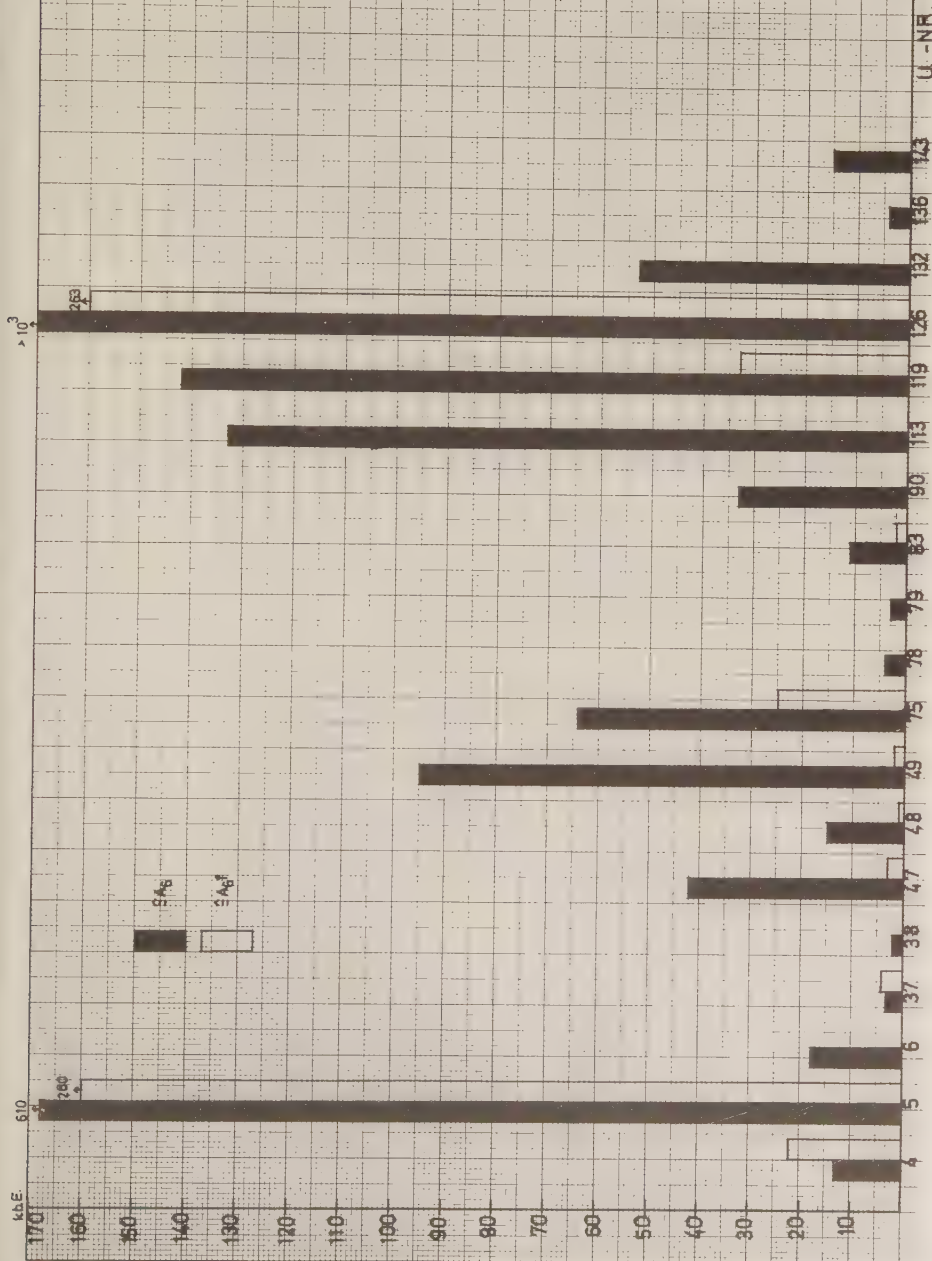
Tab. 8: Positive T - Mycoplasma - Befunde auf mit unfiltriertem (A_6) und filtriertem (A_6^f) Untersuchungsmaterial beimpftem A_6 - Agarmedium.

Positive Befunde insgesamt	positiv auf A_6	positiv auf A_6^f
19 ^{x)}	19 ^{x)}	12

^{x)} In zwei Fällen waren die A_6 - Platten wegen Kontamination nicht zu beurteilen.

Auf den mit unfiltriertem Urin beimpften A_6 - Agarplatten (A_6) ließen sich in 17 Fällen mehr T - Mycoplasma - Kolonien auszählen als auf den mit filtriertem Material beimpften A_6 - Vergleichsplatten (A_6f). Zweimal fanden sich mehr Kolonien auf den Platten mit filtriertem Inoculum. Eine Gegenüberstellung der ausgezählten Kolonien zeigt die Tabelle 9.

Tab. 9: Vergleich des Wachstums von T - Mycoplasma - Kolonien auf dem mit unfiltriertem (A₆) und filtriertem Untersuchungsmaterial (A₆^f) beimpften A₆ - Agarmedium. Kolonienzahl pro 10 ml.



Quantitativer Vergleich: Beim abschließenden quantitativen Vergleich der Nährmedien mit Subkulturen wurden folgende Ergebnisse gefunden:

Bei den flüssigen Medien wurde ein selbst hergestellter U_9 - Nährboden mit einer U_9 - Probe, die uns von SHEPARD zur Verfügung gestellt worden war, untersucht. Auch das flüssige Urea - Medium wurde in die Untersuchung einbezogen.

Eine Rotfärbung der flüssigen U_9 - Medien trat nur bei den selbst hergestellten Medien am 2. Tag in der Konzentrationsstufe 10^0 auf. Es wurden für dieses Medium 2×10^1 ccu/ml errechnet (ccu = color changing units).

In dem Urea - Medium trat eine Rotfärbung am 2. Tag bis zur Konzentrationsstufe 10^{-4} auf. Das entsprach 2×10^5 ccu/ml.

Bei den Agarnährböden wurden ein selbst hergestellter A_6 - Agar (A_6 "eigen") und eine uns von SHEPARD zur Verfügung gestellte Probe des gleichen Nährbodens (A_6 "Shepard") untersucht. Nach Auszählung der kolonienbildenden Einheiten (kbE) auf den Agarnährböden A_6 ("eigen") und A_6 ("Shepard") ließen sich folgende Werte er rechnen:

A_6	("eigen")	-	1×10^5	kbE/ml
A_6	("Shepard")	-	5×10^4	kbE/ml

Außerdem differierte die Größe der Kolonien in Abhängigkeit von ihrer Anzahl. So fanden sich auf den Platten, die mit Kulturen der Konzentrationsstufe 10^{-3} beimpft worden waren, Kolonien mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 100 - 150 μm . Bei Platten mit einem Inokulum aus der Konzentrationsstufe 10^{-1} betrug der durchschnittliche Koloniedurchmesser 30 - 50 μm .

Der Vergleich der uns von SHEPARD zur Verfügung gestellten Nährbodenproben von Medium U_9 mit den selbst hergestellten U_9 - Medien ergab eine höhere Empfindlichkeit des SHEPARD'schen Mediums. Jedoch reichten die zur Verfügung stehenden Probenmengen nicht aus, diesen Befund genauer zu überprüfen.

DISKUSSION

Die Untersuchungen wurden an unausgewählten Mittelstrahlurinen durchgeführt. Insgesamt wurden in 15,3% der untersuchten Urine T - Mycoplasmen nachgewiesen. Da es sich bei diesen Proben um willkürlich ausgesuchtes Material des hiesigen mikrobiologischen Urin-labors handelte, sind Vergleiche mit Untersuchungen vom Material von Patienten mit manifesten Infekten des Urogenitaltraktes problematisch. Eine gleichzeitige Untersuchung von 57 Mittelstrahlurinen von LAM (27) ergab eine Kontamination mit T - Mycoplasmen bei 30% der Urine. Hierbei handelte es sich um Material von Patienten, bei denen auch Blasenpunktionen durchgeführt wurden. Die Indikation hierfür läßt schon primär eine Auswahl des Patientengutes in Richtung des klinischen Verdachtes vermuten.

Das Vorkommen von Mycoplasma hominis und anderen "klassischen" Mycoplasmen ließ sich nicht sicher beurteilen, da die verwendeten Nährböden - insbesondere ihr pH-Wert - für ihr Wachstum wahrscheinlich keine optimalen Bedingungen boten. Immerhin konnte das Wachstum von Mycoplasma hominis - Kolonien in drei Fällen neben T - Mycoplasmen nachgewiesen werden (2%). LAM (27) fand gleichzeitiges Wachstum von T - Mycoplasmen und Mycoplasma hominis in 5% der untersuchten Fällen.

Beim Vergleich der beiden verwendeten flüssigen Medien (Urea - Medium und U_9 - Medium) zeigte sich bei der Untersuchung des klinischen Materials eine etwas höhere Empfindlichkeit des U_9 - Mediums. Sie resultiert möglicherweise aus der geringen Pufferung dieses Mediums (46). Dieser Vorteil reicht allerdings nicht aus, um ausschließlich dieses Medium empfehlen zu können. Im abschließenden experimentellen Ansatz, der ohne Verwendung klinischen Materials durchgeführt wurde, zeigte das Urea - Medium eine eindeutig höhere Empfindlichkeit als das U_9 - Medium. Dies könnte darauf hindeuten, daß bei der klinischen Untersuchung Bestandteile des in das Medium verbrachten Urins dessen Eigenschaften günstig beeinflussen. Grundsätzlich besteht diese Möglichkeit auch bei den festen Nährböden.

Bei beiden flüssigen Medien wurde bei starker Trübung und gleichzeitiger Rötung keine Myco-plasma - Bewertung durchgeführt, da in diesen Fällen Wachstum von Bakterien angenommen werden konnte. Hier reichte offenbar die inhibitorische Wirkung des verwendeten Penicillin G nicht aus, das Wachstum solcher Bakterien zu unterbinden. Die Verwendung anderer, wirksamerer Hemmstoffe wie Ampicillin könnte hier möglicherweise in Betracht gezogen werden.

Die vergleichende Ablesung der Agarnährböden A_6 und A_{5c} zeigte eine Überlegenheit des A_6 - Nährbodens. Dafür gab es zwei mögliche Ursachen: auf Grund der deutlichen Braunfärbung der T - Mycoplasma - Kolonien auf dem A_6 - Nährboden waren diese sehr viel besser zu erkennen als auf dem Vergleichsnährboden A_{5c} . Zudem ermöglichte das A_6 - Medium eine eindeutige Unterscheidung der harnstoffspaltenden T - Mycoplasmen von anderen, nicht harnstoffspaltenden Mycoplasma - Stämmen, z.B. von Mycoplasma hominis.

Wurde die Anzahl der T - Mycoplasma - Kolonien auf beiden Nährböden verglichen, so waren beide etwa gleichwertig. Zwar wurden auf den A_6 - Agarplatten in 18 von 19 positiven Befunden mehr T - Mycoplasma Kolonien ausgezählt als auf dem Agarnährboden A_{5c} , jedoch war die Differenz stets gering. Eine derartige Differenz könnte auch durch einen Auszählungsfehler entstanden sein, der sich aus der besseren Darstellung (Braunfärbung) der Kolonien auf dem A_6 - Agarnährboden erklären liesse.

Die Grösse der Kolonien war auf beiden Medien gleich. Es schien jedoch eine umgekehrte Proportionalität zwischen der Kolonienanzahl und ihrem Durchmesser zu bestehen, d.h. bei sehr dichtem Wachstum waren die Kolonien klein, während einzelstehende Kolonien häufig einen großen Durchmesser besaßen (38).

Bei Ablesung der Platten am zweiten und am vierten Tag wurden keine Unterschiede in Zahl und Größe der Kolonien festgestellt, soweit diese am zweiten Tag der Bebrütung schon vorhanden waren. In drei Fällen fanden sich T - Mycoplasma - Kolonien auf beiden Agarnährböden erst am vierten Tag. Auch diese Übereinstimmung spricht für eine grundsätzliche Gleichwertigkeit beider Agarmedien.

In einem Fall wurden T - Mycoplasma - Kolonien gefunden, die dicht neben Mycoplasma hominis - Kolonien wuchsen oder diese überlagerten. In anderen Fällen fand sich ein vermehrtes Wachstum von T - Mycoplasma - Kolonien dicht neben oder auf Epithelzellen, die mit dem Inokulum auf die Nährböden gelangt waren. Solche Anlagerung von T - Mycoplasmen an größere Partikel wurde auch schon von SHEPARD (37) beschrieben.

Bei dem Vergleich des A₆ - Agarnährbodens mit dem flüssigen U₉ - Medium ergab sich eine nur geringfügig höhere Empfindlichkeit des flüssigen Mediums: nur in einem sicher zu beurteilenden Fall konnten keine T - Mycoplasma - Kolonien auf der A₆ - Agarplatte gefunden werden, obwohl eine Urease - positive Reaktion des flüssigen U₉ - Mediums beobachtet worden war. Beide Medien scheinen daher zum Nachweis von T - Mycoplasmen aus klinischem Material gut geeignet.

Es wurde schließlich versucht, durch Filtration des Untersuchungsmaterials durch ein bakterien-dichtes Nucleopore - Filter (Porengröße 0,4 μ m) selektiv die verformbaren Mycoplasmen zu filtrieren, und dabei andere größere Mikroorganismen zurückzuhalten. Es wäre dann zu erwarten gewesen, daß bei gleichzeitiger Beimpfung identischer Nährböden mit denselben Mengen filtrierten oder unfiltrierten Urins, gleiche Ergebnisse (gleichzeitig Rotfärbung der flüssigen Medien, gleiche Kolonienzahlen auf den Agarnährböden) erhalten worden wären. Eine gleichzeitige Rotfärbung der entsprechenden flüssigen Medien trat jedoch nur in 27% der Fälle auf.

Auch die Beurteilung der Agarnährböden ergab eine eindeutige Reduzierung der Anzahl von T - Mycoplasma - Kolonien durch die Filtration. Diese Methode erscheint demnach nicht geeignet, eine Kontamination der Nährböden mit unerwünschten Bakterien zu verhindern, ohne daß auch gleichzeitig die Darstellung der T - Mycoplasmen beeinträchtigt würde. Der Grund für die Unzulänglichkeit dieser Methode mag in der Neigung der T - Mycoplasmen zur Anlagerung an größere Partikel wie Epithelien oder andere Mikroorganismen zu suchen sein (37).

Auf der anderen Seite wurden Bakterien durch die Filtration zurückgehalten: in zwei Fällen waren alle mit unfiltriertem Urin beimpften Agarplatten wegen starker Kontamination durch

Bakterien nicht zu beurteilen. Auch die entsprechenden flüssigen Medien zeigten zwar eine Rotfärbung, aber ebenso eine starke Trübung. Auf den entsprechenden, mit filtriertem Urin beimpften Agarplatten fanden sich T - Mycoplasma - Kolonien ohne störendes Wachstum von Bakterienkolonien. Auch die mit filtriertem Urin beimpften Flüssigmedien zeigten eine Rötung.

Die Untersuchungen haben gezeigt, daß für den Nachweis von T - Mycoplasmen in klinischem Material jeweils ein flüssiges und ein festes Medium verwendet werden sollten. Dabei sind Agarnährböden vorzuziehen, die die Kolonien der T - Mycoplasmen auf Grund ihrer Ureaspaltung erkennen lassen. Die Kontamination mit der teilweise gleichzeitig vorhandenen Bakterienflora läßt sich durch Filtration zwar verhindern, gleichzeitig werden aber auch die T - Mycoplasmen weitgehend eliminiert. Daher ist weiterhin eine Hemmung der Bakterien durch zellwandwirksame Antibiotika, wie Penicillin oder Ampicillin zu empfehlen.

ZUSAMMENFASSUNG

Der Nachweis von T - Mycoplasmen (Ureaplasma urealyticum) ist wegen der geringen Größe ihrer Kolonien und ihrer schlechten Anzüchtbarkeit schwierig.

Ihr qualitativer Nachweis erfolgt meist mit speziellen flüssigen Medien, bei denen die Harnstoffspaltung als Indikator verwendet wird. Die Brauchbarkeit zweier solcher Medien sowie zweier Agarnährböden wurde durch Beimpfung mit Mittelstrahlurinen geprüft. Dabei nutzte der Differentialagarnährboden A₆ nach SHEPARD die Harnstoffspaltung der T - Mycoplasmen zu ihrem Nachweis aus.

Bei den flüssigen Medien (Urea - Medium und U₉ - Medium nach SHEPARD) fand sich kein wesentlicher Unterschied. Beide erscheinen zum Nachweis von T - Mycoplasmen gleich gut geeignet.

Bei den Agarnährböden erwies sich der Differentialnährboden A₆ als besonders brauchbar. Die auf ihm braun erscheinenden Kolonien der T - Mycoplasmen waren sehr leicht zu identifizieren. Im Gegensatz hierzu fanden sich auf dem normalen Agar (A_{5c} nach SHEPARD) zwar fast ebensoviele Kolonien, sie waren jedoch wesentlich schwieriger zu finden.

Eine Filtration des Untersuchungsmaterials durch ein Nucleopore - Filter (Porengröße 0,4 μm) beseitigte zwar unerwünschte Bakterien, reduzierte aber ebenfalls die Zahl der Mycoplasma - Kolonien erheblich.

L I T E R A T U R

- 1) BLACK, F.T., RASMUSSEN, O.G.: Occurrence of T-Strains and other Mycoplasmata in nongonococcal urethritis. Brit. J. Ven. Dis. 44, 324 (1968)
- 2) BONISSOL, C., BOUSQUET, C., DURIEUX, M.-F.: Contribution a l'Etude des Souches "T" des Mycoplasmes dans les Infections vaginales et uréthrales Path. Biol. 20, 909 - 918 (1972)
- 3) BREDT, W.: Mycoplasma Infektionen des Menschen. Med. Klin. 70, Nr. 1, 1 - 9 (1975)
- 4) CASPI, E., HERCZEG, E., SOLOMON, F., SOMPOLINSKY, D.: Amnionitis and T - Strain Mycoplasmaemia. Am. J. Obst. a. Gyn. 8, 1102 - 1106 (1971)
- 5) CASPI, E., SOLOMON, F., SOMPOLINSKY, D.: Early Abortion and Mycoplasma Infection. Israel J. Med. Sci. 2, 122 - 127 (1972)
- 6) CORMACK Mc, W., BRAUN, P., LEE, Y.-H., KLEIN, J.O., KASS, E.: The Genital Mycoplasmas. New Engl. J. Med. 288, 78 - 89 (1973)
- 7) CSONKA, G.W., CORSE, J.: Selective inhibition in vitro of Mycoplasma hominis by Lincomycin. Brit. J. Ven. Dis. 46, 203 - 204 (1970)

- 8) CSONKA, G.W., SPITZER, R.J.: Lincomycin, non-gonococcal urethritis, and mycoplasmata. Brit. J. Ven. Dis. 45, 52 (1969)
- 9) CSONKA, G.W., WILLIAMS, R.E.O., CORSE, J.: T - Strain Mycoplasmas in non-gonococcal urethritis. Lancet 1, 1292 - 1296 (1966)
- 10) DIENES, L., EDSALL, G.: Observations on the L - organism of Klieneberger. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 36, 740 - 744 (1937)
- 11) FORD, D.K., MacDONALD, J.: Influence of Urea on the growth of T - strain mycoplasmata. J. Bact. 93, 1509 - 1512 (1967)
- 12) FORD, D.K., RASMUSSEN, MINKEN, J.: T - Strain - PPLO as one cause of non-gonococcal urethritis. Brit. J. Ven. Dis. 38, 22 - 25 (1962)
- 13) FOWLER, W., LEENING, R.J.: T - Strain Mycoplasma in non-gonococcal urethritis. Brit. J. Ven. Dis. 45, 287 - 293 (1969)
- 14) FOY, H.M., KENNY, G.E., LEVINSOHN, E.M., GRAYSTON, J.T.: Acquisition of Mycoplasmata and T - Strains during Infancy. J. Infect. Dis 121, (1970)

- 15) GNARPE, H., FRIBERG, I.: T - Mycoplasma as a possible cause for reproductive failure. Nature 242, 120 - 212 (1973)
- 16) GUTMAN, L.T., TURCK, PETERSDORF, WEDGEWOOD: Significance of bacterial variants in urine of patients with chronic bacteriuria. J. Clin. Invest. 44, 1945 - 1952 (1965)
- 17) HAYFLICK, L., CHANOCK, R.M.: Mycoplasma species of Man. Bact. Rev. 29, 185 - 221 (1965)
- 18) HAYS, W.L.: Test for matched paires. In: Holt, Rinehart & Winston. New York 1963
- 19) HOFSTETTER, A., SCHMIEDT, E.: Mykoplasmenvorkommen bei entzündlichen Erkrankungen des Urogenitaltraktes. "Der Urologe" 4, 200 - 204 (1970)
- 20) HOFSTETTER, A., VOGT, H.J., GRAF, R.: Mykoplasmen und Fertilität des Mannes, Helvet. Chir. Act. 38, 471 - 474 (1971)
- 21) JANSSON, E., LASSUS, A., STUBB, S., TUURI, S.: Studies on T - strain mycoplasmas in non-gonococcal urethritis. Brit. J. Ven. Dis. 47, 122 - 125 (1971)

- 22) JONES, D.M., TOBIN, E.M.: Isolation of mycoplasmas and other organisms from the placenta after Caesarean Section. J. Med. Microbiol. 2, 347 - 352 (1969).
- 23) KELLER, R., MORTON, H.E.: Susceptibilities of Kazan, Nichols, Reiter strains of treponemata and P.P.L.O. to the antibiotic erythromycin (Ilotycin). Amer. J. Syph. Gon. Ven. Dis. 37, 379 - 382 (1953)
- 24) KLEIN, J.O., BUCKLAND, D., FINLAND, M.: Colonization of newborn infants by mycoplasmas. New Engl. J. Med. 280, 1025 - 1030 (1969)
- 25) KUNDSIN, R.B., AMPOLA, M., STREETER, S., NEURATH, P.: Chromosomal aberrations induced by T - strain mycoplasma. J. Med. Genet. 8, 181 (1971)
- 26) KUNDSIN, R.B., DRISCOLL, S.G., MING, P.L.: A strain of mycoplasma associated with human reproductive failure. Science 157, 1573 - 1574 (1967)
- 27) LAM, P.S.: Dissertation in Vorbereitung
- 28) LEE, Y-H., BAILEY, P.E., CORMACK Mc, W.M.: T - Mycoplasmas from urine and vaginal specimens: Decreased rates of Isolation and Growth in the presence of Thallium Acetate. J. Infect. Dis. 125 (1972)

- 29) LIN, J.-S., KASS, E.H.: Serotypic heterogeneity in isolates of human genital T - Mycoplasmas. Infect. a. Imm. Mar. 1973, 499 - 500 (1973)
- 30) PRAZNIK, J.: Technics for culturing mycoplasma species from clinical specimens. Amer. J. Clin. Pathol. 52, (1969)
- 31) PURCELL, R.H.D., TAYLOR, R., WONG, D., CHANOCK, R.M.: Color test for the measurement of anti-body to T - strain mycoplasma. J. Bact. 92, 6 - 12 (1966)
- 32) ROMANO, N., ROMANO, F., CAROLLO, F.: T - strains of Mycoplasma in bronchopneumonic lungs of an aborted fetus New Engl. J. Med. 285, 950 - 952 (1971)
- 33) SHEPARD, M.C.: The recovery of P.P.L.O. from negro men with and without non-gonococcal urethritis. Amer. J. Syph. Gon. Ven. Dis. 38, 113 - 124 (1954)
- 34) SHEPARD, M.C.: T - form colonies of P.P.L.O. . J. Bact. 71, 362 - 369 (1956)
- 35) SHEPARD, M.C.: Visualization and morphology of P.P.L.O. in clinical material. J. Bact. 73, 162 - 171 (1957)

- 36) SHEPARD, M.C.: Human Mycoplasma Infections.
Health Lab. Sci. 3, 163 - 169 (1966)
- 37) SHEPARD, M.C.: Cultivation and properties of
T - strains of mycoplasma associated
with non-gonococcal urethritis. Ann.
N.Y. Acad. Sci. 143, 505 -514 (1967)
- 38) SHEPARD, M.C.: Fundamental biology of the
T - strains In: Hayflick L. (ed):
The Mycoplasmatales and the L - Phase
of Bacteria. North Holland Publishing
Company, Amsterdam 1969
- 39) SHEPARD, M.C.: Nongonococcal urethritis associated
with human strains of T - Mycoplasma. J.
Amer. Med. Ass. 211, (1970)
- 40) SHEPARD, M.C.: Quantitative relationship of Urea-
plasma urealyticum to the clinical course
of nongonococcal urethritis in the human
male. Proc. Int. Congr. on Mycoplasmas
of man, animals, plants and insects.
Bordeaux (1974)
- 41) SHEPARD, M.C., ALEXANDER, C.E., LUNCEFORD, C.D.,
CAMBELL, P.E.: Possible role of T - strain
mycoplasma in non-gonococcal urethritis -
a sixth venereal disease? J.A.M.A. 188,
729 - 735 (1964)

- 42) SHEPARD, M.C., HOWARD, D.R.: Identification of T - Mycoplasma in primary agar cultures by means of a direct test for urease. Ann. N.Y. Acad. Sci. 174, 809 - 819 (1970)
- 43) SHEPARD, M.C., LUNCEFORD, C.D.: Effect of pH on human Mycoplasma - strains. J. Bact. 89, 265 - 270 (1965)
- 44) SHEPARD, M.C., LUNCEFORD, C.D., BAKER, R.L.: T - strain mycoplasma. Selective inhibition by erythromycin in vitro. Brit. J. Ven. Dis. 42, 21 - 24 (1966)
- 45) SHEPARD, M.C., LUNCEFORD, C.D.: Occurence of urease in T - strains of mycoplasma. J. Bact. 93, 1513 - 1520 (1967)
- 46) SHEPARD, M.C., LUNCEFORD, C.D.: Urease Color test medium U₉ for the detection and identification of T - Mycoplasma in clinical material. Appl. Microbiol. Oct. 1970 539 - 543 (1970)
- 47) SOMPOLINSKY, D., SOLOMON, F., LEIBA, H., CASPI, E., LEVINSOHN, G., ALMOG, C.: Puerperal sepsis due to T - strain mycoplasma. Israel J. Med. Sci. 7, 745 - 748 (1971)

- 48) SUELTSMANN, S., ALLEN, V., INHORN, S.L.,
BENFORADO, M.: Study of mycoplasma
in university students with non-gono-
coccal urethritis. Health Lab. Sci. 8,
(1971)
- 49) SWIERCZEWSKI, J.A., REYES, P.: Isolation of
L - forms in a clinical microbiology
laboratory. Appl. Microbiol. Sept. 1970,
323 - 327 (1970)
- 50) WESTRÖM, L., MARDH, P.-A.: The effect of anti-
biotic therapy on mycoplasma in the
female genital tract. Acta Obstet Gynec.
Scand. 50, 25 - 31 (1971)

Ich bedanke mich besonders bei Herrn Professor Dr. med. W. BREDT für die Überlassung des Themas und seine stetige Beratung und Unterstützung während jeder Phase dieser Arbeit.

Dank sage ich auch der medizinisch-technischen Assistentin Frau DONARSKI für ihre freundliche Unterweisung in den Arbeitsmethoden und Hilfe bei der Herstellung des Bildmaterials.

LEBENS LAUF

Am 5. Januar 1947 wurde ich, Helmut Bink, als erster Sohn des Kaufmanns Karl - Heinz Bink und seiner Ehefrau Hannelore, geb. Müller, in Wetzlar/Lahn geboren.

Von 1953 bis 1957 besuchte ich die Volksschule und anschließend das Goethe-Gymnasium in Wetzlar. Hier legte ich im Herbst 1966 meine Reifeprüfung ab.

Vom Januar 1967 bis zum Dezember 1968 diente ich als Sanitäter bei der Bundeswehr.

Im Sommer 1969 begann ich mein Medizinstudium an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz. Nach dem Vorphysikum, das ich im Sommer 1970 bestand, und dem Physikum im Sommer 1972, möchte ich jetzt, im Sommer 1975, nach sechs Semester klinischen Studiums mein Staatsexamen ablegen.

Nach Ableistung meiner Medizinalassistentenzeit und der Approbation beabsichtige ich, eine Facharztausbildung in der Inneren Medizin zu beginnen.



